

システイン残基導入変異体と架橋試薬ベンゾフェノン-4-マレイミド
を用いたガレクチン-1 リガンド探索方法に関する研究

佐藤真由美

目次

略語

諸言.....	1
---------	---

第 1 章 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体タンパク質の調製	4
--	---

1-1 実験方法.....	5
---------------	---

1-1-1 ヒトガレクチン-1 Cys-less および K28C 発現用プラスミドの調製	5
---	---

1-1-2 ヒトガレクチン-1 D123C タンパク質発現用プラスミドの調製	5
--	---

1-1-3 その他のシステイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体タンパク質発現用プラスミドの調製.....	5
---	---

1-1-4 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体タンパク質の発現、精製.....	5
--	---

1-2 結果.....	6
-------------	---

1-3 考察.....	8
-------------	---

第 2 章 システイン残基導入がガレクチン-1 の糖結合特性へ与える影響の解析	9
---	---

2-1 実験方法.....	10
---------------	----

2-1-1 実験材料	10
------------------	----

2-1-2 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体の発現・精製	10
--	----

2-1-3 フロンタルアフィニティークロマトグラフィーによる糖結合特性の解析	10
--	----

2-2 結果.....	11
-------------	----

2-3 考察.....	16
-------------	----

第 3 章 システイン導入ヒトガレクチン-1 変異体とモデル糖タンパク質リガンドとの架橋反応.....	17
---	----

3-1 実験方法.....	17
---------------	----

3-1-1 実験材料	17
------------------	----

3-1-2 架橋反応用アシアロフェツインの調製.....	17
------------------------------	----

3-1-2 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体の調製	17
---------------------------------------	----

3-1-3 架橋反応	18
------------------	----

3-1-4 架橋反応検出方法（ウエスタンブロット）	18
---------------------------------	----

3-2 結果.....	18
-------------	----

3-2-1 アシアロフェツインのゲル濾過による精製.....	18
--------------------------------	----

3-2-2 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 とアシアロフェツインの架橋反応	19
--	----

3-2-3 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体とラミニンの架橋反応	21
--	----

3-3 考察.....	23
-------------	----

第4章 システイン導入ヒトガレクチン-1 変異体と Jurkat 細胞上のリガンドとの架橋反応.....	25
4-1 実験方法.....	25
4-1-1 実験材料	25
4-1-2 C 末端側 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C 発現用プラスミドの調製.....	25
4-1-3 C 末端側 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C タンパク質の調製.....	25
4-1-4 C 末端側 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C タンパク質の質量分析.....	26
4-1-5 Jurkat 細胞の培養方法.....	26
4-1-6 ガレクチン-1 が Jurkat 細胞生存能に与える影響の測定.....	26
4-1-7 架橋反応に用いる Jurkat 細胞懸濁液の調製.....	27
4-1-8 C 末端 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C と Jurkat 細胞の架橋反応	27
4-2 結果.....	27
4-2-1 質量分析によるシステイン残基への BPM 結合の確認	27
4-2-2 ガレクチン-1 が Jurkat 細胞生存能に与える影響.....	28
4-2-3 Jurkat 細胞上のリガンドとの架橋反応の結果.....	29
4-3 考察.....	30
結論.....	32
参考文献.....	34
謝辞	

略語

ASF	asialofetuin
BPM	benzophenone-4-maleimide
CBB	coomassie brilliant blue
DMF	dimethylformamide
EDTA-ME-PBS	20 mM Na-phosphate, pH 7.2, 150 mM NaCl, 4 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA
EDTA-PBS	20 mM Na-phosphate, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
FAC	frontal affinity chromatography
hGal-1	human galectin-1
PCR	polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

諸言

糖鎖には、デンプンやグリコーゲンなどのエネルギー源、セルロースなどの繊維のほかに、タンパク質や脂質に結合した情報分子として働く複合糖質と呼ばれるものがある。医療の分野では、正常細胞と腫瘍細胞が形成する糖鎖構造の違いを利用した腫瘍マーカー、腎性貧血に使用される赤血球造血因子エリスロポエチンの活性、抗体医薬品の抗体依存性細胞障害活性などに糖鎖に関わることが知られている。また、糖鎖はほかにもウイルスや細菌の感染にも関わっている。例えば、インフルエンザウイルスは、ウイルスがもつレクチンであるヘマグルチニンが細胞表面のシアル酸と結合し、細胞内に侵入していく。ウイルスは、細胞内で増殖後、細胞外に出ていくが、そのとき、邪魔になるシアル酸をウイルスのノイラミニダーゼ（シアル酸分解酵素の一種）が切断し、細胞外へ出ていく。抗インフルエンザウイルス薬オセルタミビルは、このノイラミニダーゼを阻害する。

レクチンは糖鎖を認識するタンパク質で、白血球が炎症部位へ遊走する際のローリングや血清糖タンパク質の品質管理、その他細胞分化、細胞接着、シグナル伝達など重要な生命現象に関与している。

レクチンの一種であるガレクチンは、*N*-アセチルラクトサミン（Gal β 1-4GlcNAc）などの β -ガラクトシド構造に親和性があり、糖認識部位に保存された配列を持ち、海綿、線虫などの無脊椎動物から、ニワトリ、ヒトなどの脊椎動物まで生物界に広く保存されている。哺乳類ではガレクチン-1~15 まで発見されており、ヒトには 10 種類以上のガレクチンが存在しており、発生、細胞分化、がん、アポトーシス、RNA スプライシング、免疫機能の調節など様々な生命現象に関わる（Kasai, K. *et al.*, 1996; Leffler, H. *et al.*, 2004; Cooper, D. N. and Barondes, S. H., 1999; Liu, T. and Rabinovich, G.A., 2005; Hernandez, J. D., and Baum, L.G. 2002）。ガレクチンファミリーに共通した機能はなく、1 つのガレクチンが複数の機能に関与する（「1 つのガレクチンに 1 つの機能」という関係ではない（Kasai K., 1997)）。例えば、ガレクチン-3 は RNA スプライシング、アポトーシスの抑制、角膜の創傷治癒（Saravanan C., *et al.*, 2009）など様々な機能を持つ。

しかし、ガレクチンを含むレクチンの機能には不明な点も多く残されている。レクチンの分子レベルでの機能解明には、そのリガンドの単離・同定が不可欠だが、困難を伴うことも多い。理由として、レクチンと糖鎖の相互作用が比較的弱いこと、糖鎖構造が均一でないこと（同種のタンパク質または脂質に複数の糖鎖が結合している場合や、細胞の種類や分化段階により糖鎖構造が変化する場合がある）、レクチンの糖鎖認識がフuzzyであることなどが挙げられる。

ガレクチンファミリーの一つであるガレクチン-1 は、分子内に糖認識部位を一つ持ち、胎盤、脳、血管、消化管など幅広い組織に分布している。T 細胞のアポトーシス誘導や血管新生などの働きが報告されているが、そのリガンドの情報についてはやはり充分と

は言えない。

ガレクチンファミリーの一つであるガレクチン-1 は、胎盤、脳、血管、消化管など幅広い組織に分布している。分子内に糖認識部位を一つ持ち、Cys 残基が 6 つ存在し、酸化されると糖結合活性を失う。アミノ酸配列の 2 番目の Cys をセリン (Ser) に置換した組み換え体は、糖結合活性は維持されたまま酸化的失活が抑えられる (Hirabayashi, J., and Kasai, K. 1991; Hirabayashi, J., and Kasai, K. 1994)。また、6 つの Cys をすべて Ser に置換した組み換え体も野生型とほぼ同等の活性を持つことが報告されている (Nishi, N. *et al.*, 2008)。

そこで、本研究では Cys 残基を 1 つ持つ Cys 導入ヒトガレクチン-1 (hGal-1) 変異体と二価性架橋試薬ベンゾフェノン-4-マレイミド (BPM) を用いて、ガレクチンとそのリガンドを安定な共有結合で架橋し、これまで同定できなかった新たなリガンドを単離する方法の確立を目指した。BPM は SH 基と反応して共有結合を形成するマレイミド基と、紫外線照射により近傍の炭素原子と結合するベンゾフェノン基をもった二価性の架橋試薬である (Dormán G. and G. D. Prestwich, 1994; Arata, Y. *et al.*, 2002a; Arata, Y. *et al.*, 2002b)。

BPM を用いた架橋反応の原理を次頁の図に示す。1. hGal-1 に導入された Cys 残基に BPM のマレイミド基を結合させる。2. 糖タンパク質リガンド溶液に添加し、紫外線を照射することで、ベンゾフェノン基と近傍の炭素原子 (ガレクチンと相互作用しているリガンド) と架橋を形成させる。

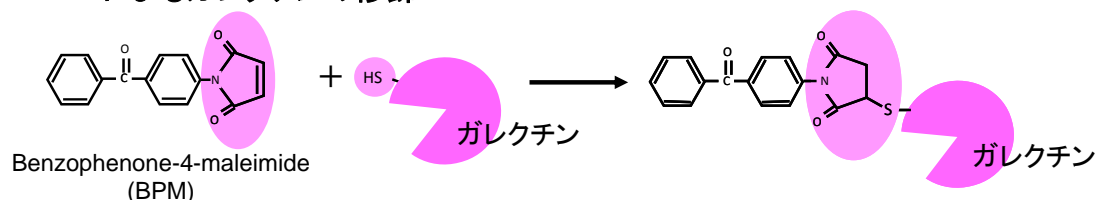
本研究では、最初に BPM のマレイミド基と結合可能な Cys 残基を一つだけ持つ、Cys 導入 hGal-1 変異体を複数作製した。hGal-1 の 6 つの Cys をすべて Ser に置換した組み換え体 (Cysless) も野生型とほぼ同等の活性を持つことが報告されており (Nishi, N. *et al.*, 2008)、この Cysless 体の hGal-1 の cDNA を用いて新たな Cys 残基を導入した。各 Cys 導入 hGal-1 変異体が糖結合能を保持していることを確認し、モデル糖タンパク質リガンドと BPM を介した架橋産物形成を行った。モデル糖タンパク質リガンドとして、ガレクチンの研究によく使用されており、ガレクチンが認識する *N*-アセチルラクトサミン構造を持つアシアロフェツイン (ASF) と、ガレクチン-1 の生体内リガンドとして報告されているラミニン (Ozeki, Y. *et al.*, 1995) を用いた。

ガレクチン-1 が T 細胞のアポトーシスを誘導することが知られており、ガレクチン-1 誘導性 T 細胞アポトーシスのリガンドとして、CD2、CD3、CD7、CD43、CD45 などが報告されている (Camby I., *et al.*, 2006)。しかし、アポトーシス誘導に CD45 が必須でない場合もあり、詳細な分子メカニズムに不明な点も残されている。そこで、野生型 hGal-1 と比較して糖結合特性が大きく変わらず、モデル糖タンパク質と BPM を介した架橋産物が形成された hGal-1 K28C (hGal-1 の 28 番目の Lys を Cys に置換した変異体) を用いて T 細胞の細胞死誘導に関わるリガンドとの架橋形成を行った。

このように細胞表面に存在するガレクチンリガンドを BPM により架橋して捉えるこ

とで、比較的弱い相互作用をするリガンドであっても単離が可能になると考えられ、今後、ガレクチンリガンドの網羅的な単離・解析によるガレクチンの分子レベルでの機能解明に役立つと考えられる。また、本方法はガレクチンだけでなく、相互作用は弱くても重要な生体物質の単離・同定・解析にも応用できると考えられる。

1. BPMによるガレクチンの修飾



2. 紫外線照射による架橋

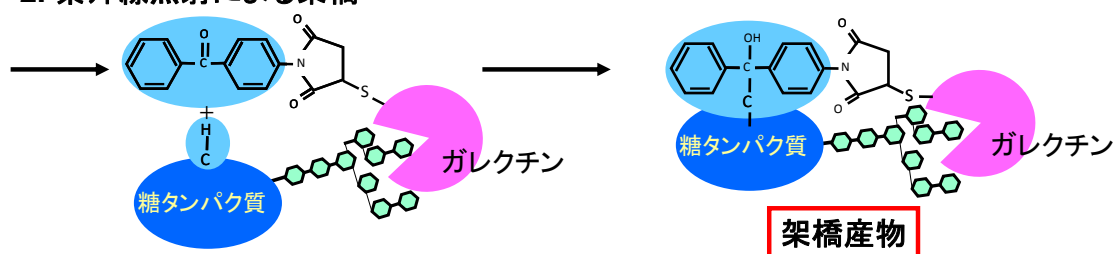


図 BPM を用いた架橋反応の原理

第1章 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体タンパク質の調製

最初に、架橋試薬ベンゾフェノン-4-マレイミド (BPM) を結合させるシステイン (Cys) 残基を一つだけ持つ、Cys 残基導入ヒトガレクチン-1 (hGal-1) 変異体の調製を行った。筆者は線虫 (*Caenorhabditis elegans*) ガレクチン LEC-1 へ Cys 残基を一つ導入した変異体とモデル糖タンパク質リガンドアシアロフェツイン (ASF) の、BPM を介した架橋産物形成に成功している (Arata Y. *et al.*, 2006; Tamura, M. *et al.*, 2011)。このときの LEC-1 への Cys 残基導入部位および、ガレクチン-1 の X 線結晶構造解析データ (Lopez-Lucado M. F. *et al.*, 2004) をもとに、hGal-1 への Cys 残基導入部位を検討した。Cys 導入部位は、BPM がリガンドとの結合を阻害しないように、糖認識部位周辺の側鎖がリガンド側を向いているアミノ酸残基を選択した。6 か所 Ser⁷、Lys²⁸、Ala⁵¹、Lys⁶³、Ala¹²¹、Asp¹²³ のアミノ酸残基を Cys 残基へ置換した 6 種類の変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C を作製した (図 1-1)。すべての Cys 導入 hGal-1 変異体は、大腸菌に発現させ、ASF (ガレクチン-1 と相互作用する *N*-アセチルラクトサミン構造をもつ) 固定化セファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、ガレクチンとしての糖結合能を保持しているか確認した。

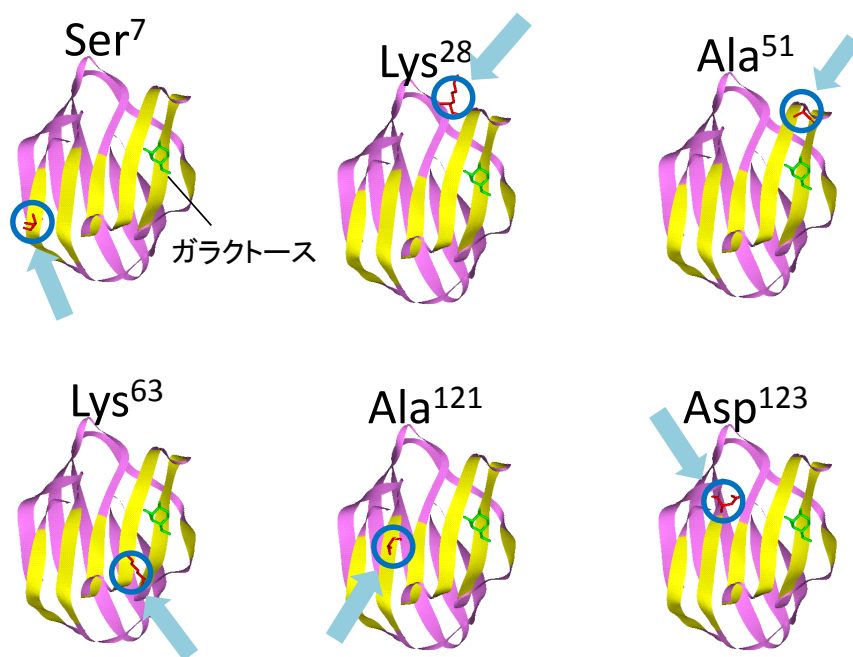


図 1-1 hGal-1 への Cys 残基導入部位

黄色部分は糖認識部位、緑はガラクトース、赤は Cys に置換したアミノ酸残基 (矢印で示した) を示す。ガレクチン-1 の X 線結晶構造解析データ (Lopez-Lucado M. F. *et al.* 2004) をもとに作成。

1-1 実験方法

1-1-1 ヒトガレクチン-1 Cys-less および K28C 発現用プラスミドの調製

hGal-1 Cys-less DNA (内在性の 6 つの Cys をすべて Ser に置換したもの) および K28C (Cys-less の Lys²⁸ を Cys に置換したもの) は、Altered Site II *in vitro* mutagenesis system (Promega) を用いた部位特異的突然変異により、帝京大学大学院 五十嵐が作成したものをを用いた (Tamura, M. *et al.*, 2009)。

1-1-2 ヒトガレクチン-1 D123C タンパク質発現用プラスミドの調製

五十嵐が作成した hGal-1 Cys-less DNA をタンパク質発現用プラスミド pET21a へ組み込んだものを鋳型とし、変異導入用プライマー (下線は変異導入部位) 5'-TGTGGTGACTTTTAAAATCAAAAG-3' と 5'-AGCTGCCATGTAGTTGATG-3'を用いた polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。増幅させた PCR 産物を T4 DNA kinase、T4 DNA ligase (Takara Bio Inc.) を用いて環状化し、hGal-1 D123C タンパク質発現用プラスミド pET21a-hGal-1 D123C を作製した (Takeuchi, T. *et al.*, 2009)。変異導入は DNA シーケンス解析により確認した。

1-1-3 その他のシステイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体タンパク質発現用プラスミドの調製

hGal-1 S7C、A51C、K63C、A121C タンパク質発現用プラスミドは、hGal-1 D123C タンパク質発現用プラスミドの調製と同様の方法で、城西大学大学院 渡邊が作成したものをを用いた (Tamura, M. *et al.*, submitted)。

1-1-4 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体タンパク質の発現、精製

Cys 導入 hGal-1 変異体 DNA が pET21a に組み込まれたプラスミド DNA により大腸菌 BL21(DE3)を形質転換した。これを 125 µg/mL の ampicillin (Amp) を含む 10 mL の LB/Amp 培地 (1% bacto-tryptone, 0.5% Bacto-yeast extract, 1% NaCl) で、37°C で一晩培養後、125 µg/mL Amp を含む 250 mL の 2×YT 培地 (1.6% Bacto-tryptone, 1% Bacto-yeast extract, 0.52% NaCl) に移し、37°Cにて、OD₆₀₀ が 0.6-0.8 になるまで培養した。氷上で培養液を冷却した後、終濃度 0.4 mM の IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside) を添加し、20°Cで一晩培養することで Cys 導入 hGal-1 変異体タンパク質の発現を誘導した。この大腸菌を回収し、超音波 (vibra collTM, SONIC) 破碎後、遠心 (TOMY, CAX-370, 14,000 rpm, 30 分間, 4°C) し、上清を大腸菌抽出液として回収した。回収した大腸菌抽出液を ASF 固定化セファロースカラム (ベッド体積 5 または 10 mL、ASF 固定化量 5 mg/mL) に添加した。50 mL の EDTA-ME-PBS (20 mM Na-phosphate, pH 7.2, 150 mM NaCl, 4 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA) によりカラムを洗浄後、結合したタンパク質を 0.1 M ラ

クトースを含む EDTA-ME-PBS により溶出した。カラムからの溶出液を回収し、sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 後、coomassie brilliant blue (CBB) 染色することで、Cys 導入 hGal-1 変異体タンパク質が精製されたことを確認した。

精製されたリコンビナントタンパク質を含む溶出画分を回収し、EDTA-PBS (20 mM Na-phosphate, pH 7.2, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) に対して透析または Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices (10,000 NMWL, Millipore) を用いた限外ろ過により、2-mercaptoethanol およびラクトースを除いた。

なお、hGal-1 K28C は五十嵐が、hGal-1 S7C、A51C、K63C、A121C は渡邊が調製したものをを用いた。

1-2 結果

大腸菌により hGal-1 D123C タンパク質発現後、ASF 固定化セファロースカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。カラムからの溶出フラクションのタンパク質濃度を定量した結果を図 1-2 に示す。いくつかのフラクションを SDS-PAGE 後、CBB 染色した結果を図 1-3 に示す。その結果、hGal-1 D123C は ASF 固定化セファロースカラムに結合し、競合糖ラクトースにより溶出された。

他の Cys 導入 hGal-1 変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C についても、ASF 固定化カラムにより精製し、カラムからの溶出フラクションを SDS-PAGE 後、銀染色または CBB 染色により検出したとき、ラクトース溶出画分にガレクチン-1 の分子量である 15 kDa に単一のバンドとして検出されたことを、五十嵐、渡邊が確認している (Tamura, M. *et al.*, submitted.)。

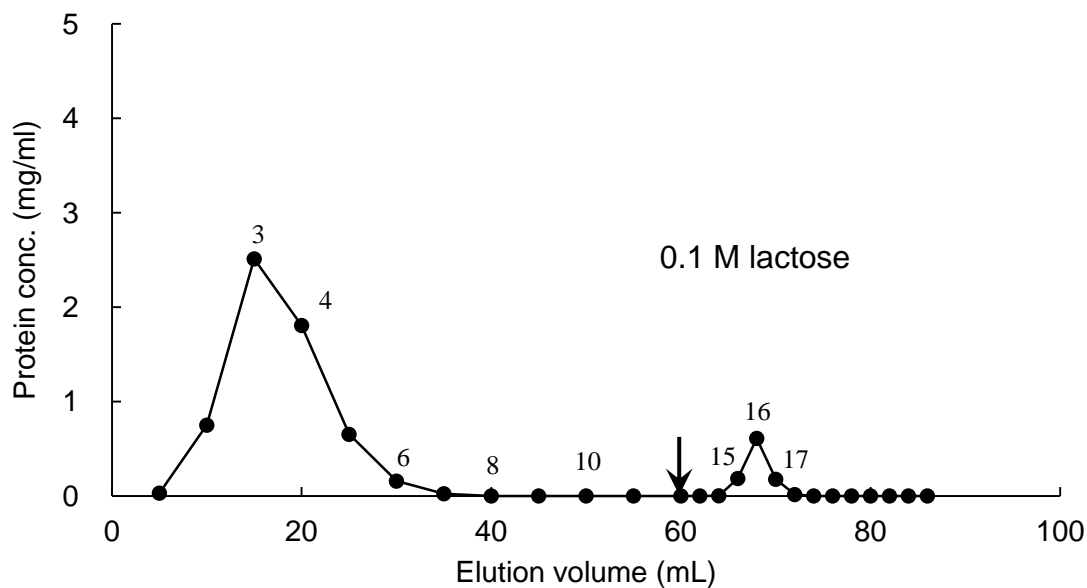


図 1-2 hGal-1 D123C の ASF 固定化セファロースカラムによるアフィニティー精製
hGal-1 D123C を発現させた大腸菌の抽出液を ASF 固定化セファロースカラムに添加した。カラムを EDTA-ME-PBS で洗浄後、吸着した hGal-1 D123C タンパク質を 0.1 M ラクトースにより溶出した。カラムからの溶出画分は、洗浄中は 5 mL、ラクトースによる溶出画分は 2 mL ずつ回収した。グラフ内の数字はフラクション番号を示す。

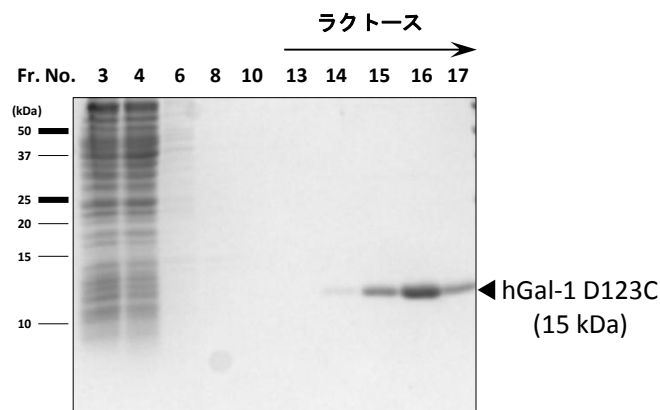


図 1-3 hGal-1 D123C の ASF 固定化カラムによるアフィニティー精製
hGal-1 D123C を発現させた大腸菌の抽出液をアシアロフェツイン固定化セファロースカラムに添加した。カラムからの溶出フラクションを SDS-PAGE により分離後、CBB 染色により検出した。分子量マーカーは図の左側に示した。

1-3 考察

大腸菌により hGal-1 D123C タンパク質を発現させ、大腸菌抽出液を ASF 固定化セファロースカラムに添加したところ、hGal-1 D123C タンパク質は、ガレクチンが認識する *N*-アセチルラクトサミン構造を持つ ASF 固定化カラムに結合し、競合糖ラクトースにより溶出された。このことから Asp¹²³ の Cys への置換は、ガレクチンとしての糖結合能にほとんど影響しないと考えられる。その他の Cys 導入 hGal-1 変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C も同様に、ASF 固定化カラム結合しラクトースにより溶出されることを五十嵐、渡邊が確認している。いずれの変異体もガレクチンとしての糖結合能を保持していることを確認した。

第2章 システイン残基導入がガレクチン-1の糖結合特性へ与える影響の解析

第1章で調製した Cys 導入 hGal-1 変異体はすべて ASF 固定化セファロースに結合し、競合糖ラクトースにより溶出されたので、ガレクチンとしての基本的な糖結合能は保持していると考えられる。しかし、ガレクチンは、ガレクチンが認識する基本骨格 *N*-アセチルラクトサミン構造へ様々な糖が置換した場合も、結合力に差はあるが認識する。糖結合特性が大きく変わってしまうと、hGal-1 の生体内でのリガンドと相互作用できなくなるため、Cys 導入変異が糖結合特性へ与える影響について、より詳細な糖結合プロフィールをフロンタルアフィニティークロマトグラフィー (FAC) により調べた。

FAC は、カラムに固定化された物質 B に、相互作用を調べたい物質 A (濃度を $[A]_0$ とする) をカラムに流し続け、A が漏れ出てきた溶出容積を測定し、A と B の相互作用を定量的に解析する方法である (笠井ら 1991; Hirabayashi, J. *et al.*, 2002; Arata, Y. *et al.*, 2001)。

このとき、カラムからの溶出容積を横軸に、物質 A の濃度を縦軸としたグラフを図 2-1 に示す。B と相互作用しない a ではカラムを素通りし、早く溶出される (a の溶出曲線)。一方、相互作用がある A ではカラム内で相互作用するため遅れて溶出される (A の溶出曲線)。相互作用がない a の溶出容積を V_0 、相互作用がある A の溶出容積を V_f とすると、A が漏れ出てきたとき、すなわちカラム内が平衡に達したとき、カラム内で相互作用している A の量 (複合体 AB の量) は $[A]_0 (V_f - V_0)$ となる。そこでカラムに固定化されている B の全量を B_t 、解離定数を K_d とすると、 $[A]_0 (V_f - V_0) = B_t [A]_0 / ([A]_0 + K_d)$ が成り立つ。これを変形すると、 $K_d = B_t / (V_f - V_0) - [A]_0$ となる。このとき、 $[A]_0$ が K_d と比較して無視できるほど小さい ($[A]_0 \ll K_d$) と、 $V_f - V_0 = B_t / K_d$ となり、「溶出の遅れ」 $V_f - V_0$ は K_d に反比例する。結合定数 K_a は K_d の逆数なので、 K_a に比例する。

本研究ではカラムに Cys 導入 hGal-1 変異体タンパク質を固定化し、ガレクチン-1 の糖結合特性を確認するのに代表的な 9 種類の蛍光標識 (ピリジルアミノ (PA) 化) した糖鎖について調べた。糖鎖構造は図 2-2 に示す。ガレクチン-1 は、041 の糖鎖に含まれる Gal β 1-4GlcNAc の一本鎖と比較して、二本鎖 (001)、三本鎖 (002)、四本鎖 (004) と分岐が増えると結合力が増加する。Gal β 1-4GlcNAc (041) と Gal β 1-3GlcNAc (042) への結合力はほぼ同じである。また Gal β 1-3GlcNAc の Gal の 2 位へ Fuc が付加した場合 (043)、さらに 3 位に GalNAc が付加した場合 (047) でも、Gal β 1-3GlcNAc (042) とほぼ同等の結合力を示す。このような糖結合特性を各 Cys 導入 hGal-1 変異体について解析した。

hGal-1 K28C は野生型とほぼ同様の糖結合特性を示すことが確認されているため (未発表データ)、hGal-1 S7C、A51C、K63C、A121C、D123C の 5 種類について解析した。

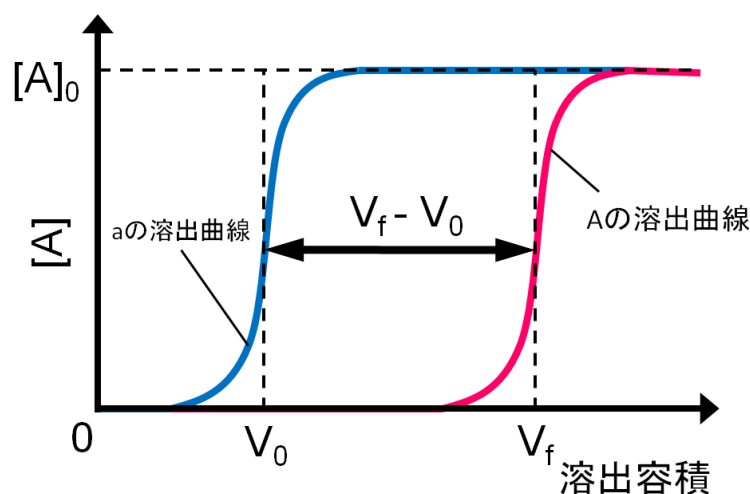


図 2-1 FAC 概念図

2-1 実験方法

2-1-1 実験材料

PA 化糖鎖は Takara Bio Inc. (大津、滋賀) から購入した。HiTrap NHS-activated カラムは GE Healthcare (Buckinghamshire, England) から購入した。ミニガードカラム (4.0×10 mm; ベッド体積 0.126 mL) は GL Sciences, Inc. (東京、日本) から購入した。

2-1-2 シス테인残基導入ヒトガレクチン-1 変異体の発現・精製

第 1 章と同様の方法で調製した。

2-1-3 フロントアフィニティークロマトグラフィーによる糖結合特性の解析

詳細な糖結合特性はフロントアフィニティークロマトグラフィー (FAC) により行った (Arata, Y. *et al.*, 2001)。まず、調製した Cys 導入 hGal-1 変異体タンパク質を HiTrap NHS-activated HP カラムへ添付のプロトコルに従い固定化した。Cys 導入 hGal-1 変異体を固定化した樹脂を取り出し、ミニガードカラムに充填した。

PA 化糖鎖は約 5 nM になるように EDTA-PBS で希釈し、2 mL を Rheodyne 7725i インジェクターに接続した 2-mL サンプルループによりカラムに添加した。サンプルループとカラムは 20°C の水浴中に浸した。流速は SHIMADZU LC-20_{AT} ポンプにより 0.25 mL/min にコントロールした。溶出した PA 化糖鎖は SHIMADZU RF-10A_{XL} 蛍光検出器により、380 nm の蛍光 (励起波長 310 nm) を検出し、各 PA 化糖鎖の溶出量 (V_f) を計算した。ガレクチンと相互作用しない PA-ラムノース (PA-Rha) の溶出量をネガティブコントロール (V_0) とし、その他の PA 化糖鎖の溶出量 (V_f) との差を求めた。測定に

用いた糖鎖は次の 9 種類を使用した。PA-001 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-3 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcAc-PA)、PA-002 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-4) Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA)、PA-004 (Gal β 1-4 GlcNAc β 1-2(Gal β 1-4GlcNAc β 1-4)Man α 1-3(Gal β 1-4GlcNAc β 1-2 (Gal β 1-4GlcNAc β 1-6) Man α 1-6)Man β 1-4GlcNAc β 1-4GlcNAc-PA)、PA-023 (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4 GlcNAc β 1-2Man α 1-3 (Neu5Ac α 2-6Gal β 1-4 GlcNAc β 1-2Man α 1-6) Man β 1-4GlcNAc β 1-4 GlcAc-PA)、PA-041 (Gal β 1-4 GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA)、PA-042 (Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4 Glc-PA)、PA-043 (Fuc α 1-2 Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-PA)、PA-047 (GalNAc α 1-3(Fuc α 1-2) Gal β 1-3GlcNAc β 1-3 Gal β 1-4Glc-PA)、PA-rhamnose (図 2-3)。

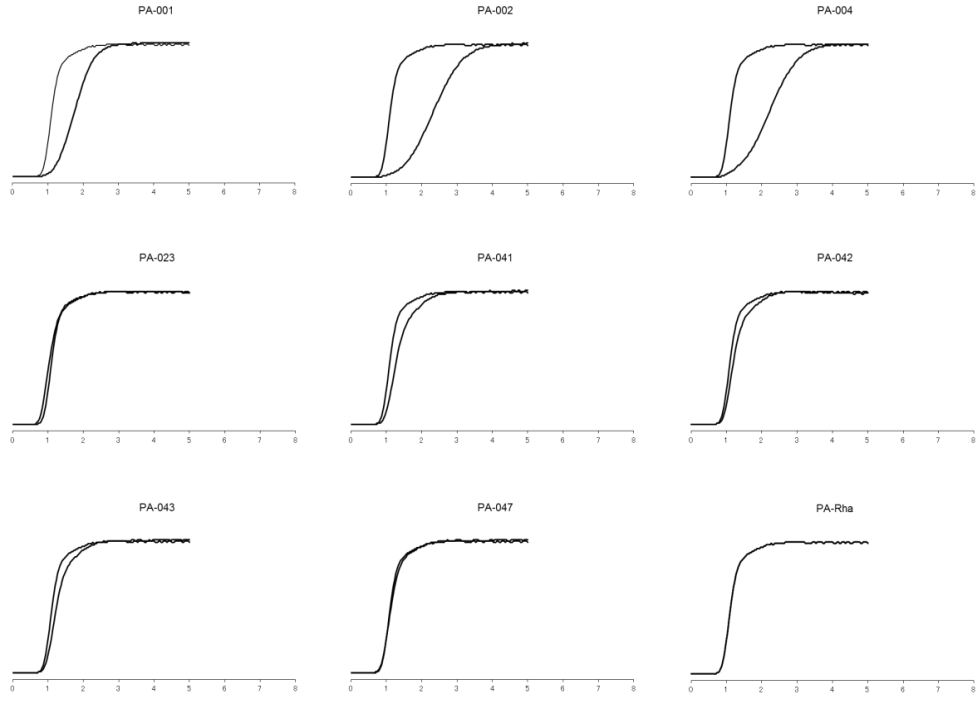
2-2 結果

各 Cys 導入 hGal-1 変異体を調製、し、HiTrap NHS-activated HP カラムへ固定化した。固定化量は、hGal-1 S7C 0.65 mg/mL、A51C 0.93 mg/mL、K63C 0.86 mg/mL、A121C 1.23 mg/mL、D123C 1.00 mg/mL だった。

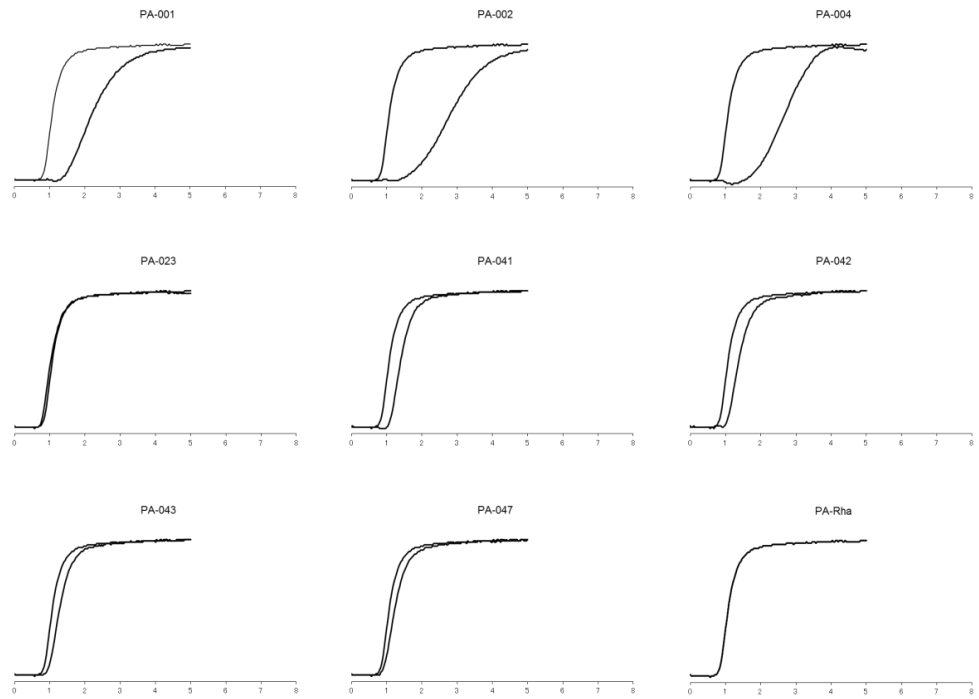
ガレクチンと相互作用を示さない PA-Rha をコントロール (V_0) として、ガレクチンの糖結合特性を調べるのに適した PA 化糖鎖 8 種 (図 2-3) に対する相対結合力を解析した。各 Cys 導入 hGal-1 変異体固定化カラムからの溶出図を図 2-2 に示す。それぞれの $V_f - V_0$ が分かりやすいように PA-Rha の溶出図と重ねている。また、表 2-1 に計算した $V_f - V_0$ の値を示す。各 Cys 導入 hGal-1 変異体の PA-001 に対する結合力を 1 としたときの、各糖鎖への相対結合力を図 2-4 に示す。

野生型と同様の糖結合活性を示す hGal-1 C2S (Cys² を Ser に置換) (Hirabayashi, J. *et al.*, 2002) と各 Cys 導入 hGal-1 変異体の糖結合特性を比較した結果、S7C、A51C、A121C は C2S と同様の糖結合特性だった。K63C、D123C では PA-041、042、043、047 に対する結合力が、若干上昇していた。

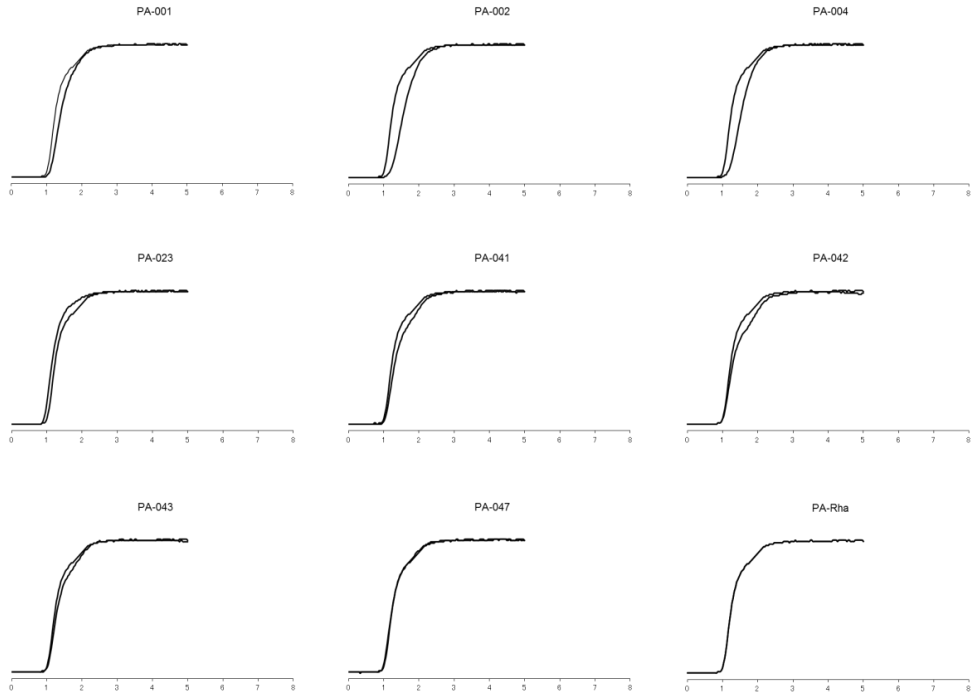
(A) S7C



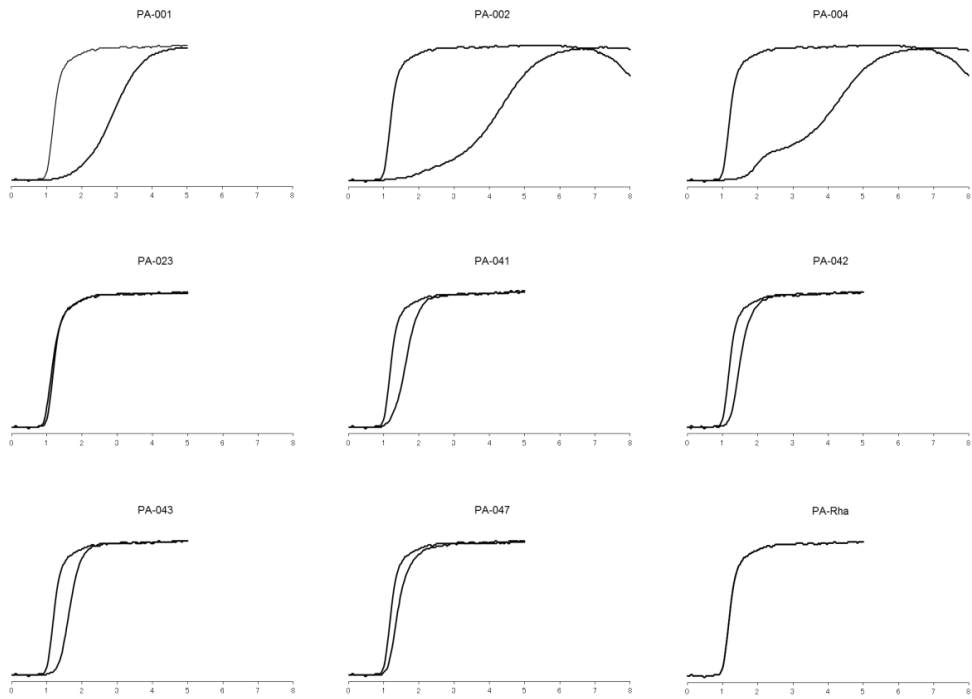
(B) A51C



(C) K63C



(D) A121C



(E) D123C

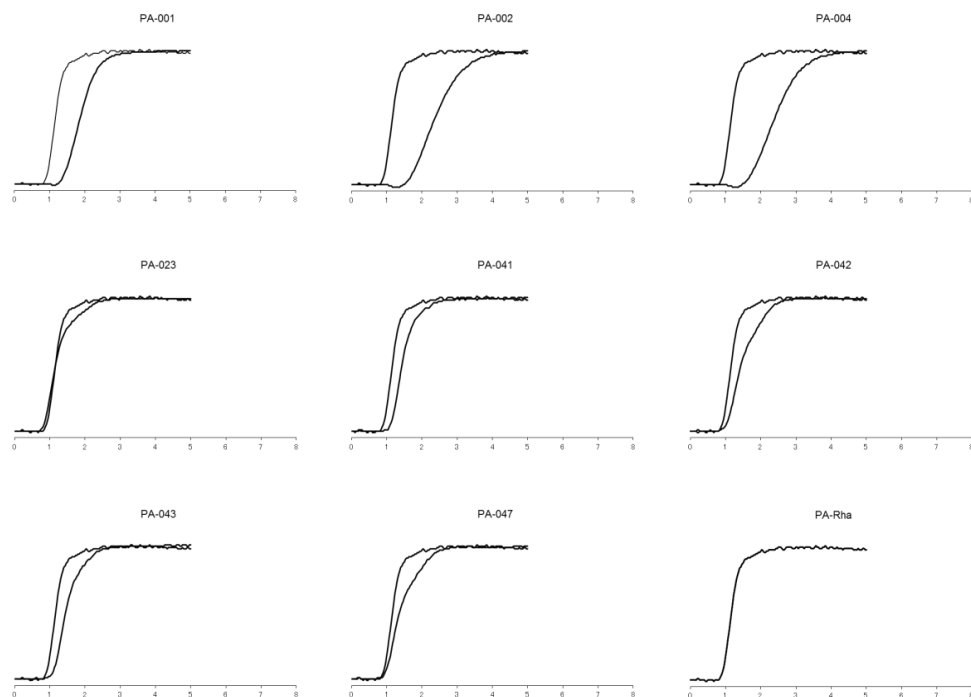


図 2-2 Cys 導入 hGal-1 変異体固定化カラムからの PA 化糖鎖溶出図

(A) hGal-1 S7C、(B) A51C、(C) K63C、(D) A121C、(E) D123C の PA 化糖鎖溶出曲線を示す。各 PA 化糖鎖の V_F/V_0 が分かりやすいように PA-Rha の溶出曲線と重ねた。

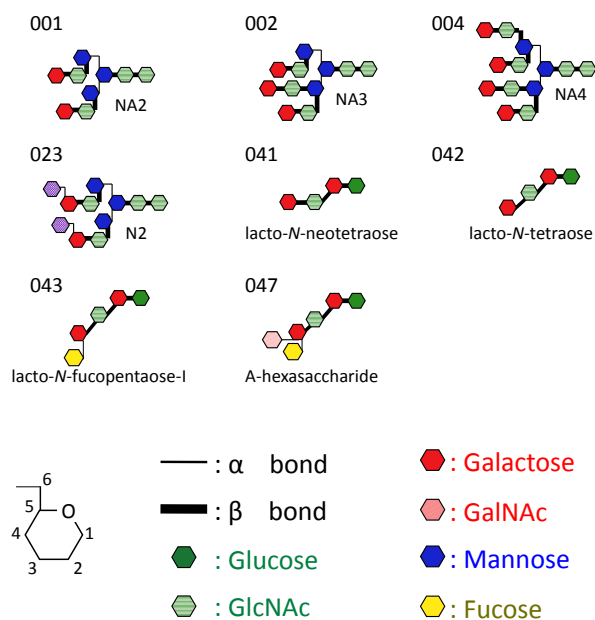


図 2-2 FAC 解析に用いた糖鎖の模式図

表 2-1 各変異体の測定した各 PA 化糖鎖の $V_f - V_0$ (mL)

	S7C	A51C	K63C	A121C	D123C
PA-Rha	----	----	----	----	----
001	0.148	0.297	0.032	0.398	0.175
002	0.294	0.433	0.064	0.698	0.312
004	0.262	0.389	0.056	0.625	0.314
023	----	----	----	----	----
041	0.053	0.081	0.026	0.093	0.075
042	0.030	0.077	0.026	0.067	0.084
043	0.034	0.050	0.015	0.097	0.078
047	0.005	0.040	----	0.050	0.066

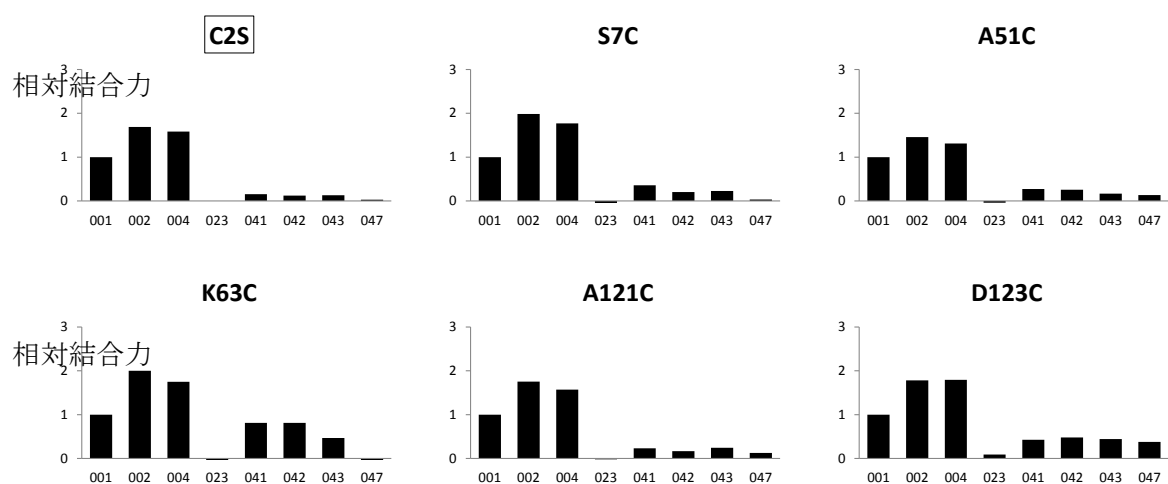


図 2-4 糖結合プロファイル

hGal-1 C2S (Hirabayashi, J. *et al.*, BBA., 2002) と各 Cys 導入 hGal-1 変異体の PA 化糖鎖に対する結合力を示した。各変異体の PA-001 に対する結合力を 1 としたときの相対結合力を示している。

2-3 考察

調製した Cys 導入 hGal-1 変異体の Cys 導入が糖結合特性へ与える影響を FAC により解析した。K63C、D123C では、C2S と比較して、PA-041、042、043、047 に対する相対結合力が若干上昇した。その他の変異体 S7C、A51C、K63C、A121C では、C2S と比較して、大きな変化は見られなかった。S7C、A51C、K63C、A121C、D123C に関して、Cys 導入変異の影響は大きくないと考えられる。よって、これらの変異体を用いることで、hGal-1 が生体内で本来相互作用しているリガンドと、BPM を介した架橋を形成できると期待できる。

第3章 システイン導入ヒトガレクチン-1 変異体とモデル糖タンパク質リガンドとの架橋反応

第1章で調製した Cys 導入 hGal-1 変異体とリガンドの、架橋試薬 BPM を介した架橋産物形成を試みた。モデル糖タンパク質リガンドとして、ガレクチンのリガンドとしてよく用いられてきた ASF(糖鎖の非還元末端のシアル酸を除いたフェツイン)、および、生体内での hGal-1 のリガンドとして知られているラミニンを用いた。

また、市販のフェツインには高分子量のタンパク質が混入していた。これが Cys 導入 hGal-1 変異体と ASF の架橋産物の検出を難しくするため、Sephadex G-75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより ASF の精製を試みた。

3-1 実験方法

3-1-1 実験材料

Sephadex G-75、GE ヘルスケア (Buckinghamshire, England) より購入した。*Clostridium perfringens* 由来シアリダーゼは New England BioLabs (Ipswich, MA, USA)より購入した。抗ウシフェツインポリクローナル抗血清と抗ヒトラミニンポリクローナル抗体は Chemicon International (Temecula, CA, USA)より購入した。BPM、ウシ胎児血清由来フェツイン、ヒト胎盤由来ラミニンは Sigma (St. Louis, MO, USA)より購入した。抗ヒトガレクチン-1 抗血清は文献 (Hirabayashi, J.*et al.*, 1987)のものを使用した。

3-1-2 架橋反応用アシアロフェツインの調製

ウシフェツイン (100 mg, 20 mg/mL) を 250 U のシアリダーゼで 37°C一晩処理することで、糖鎖の非還元末端のシアル酸を除いた。次に、1 mL のシアリダーゼ消化フェツインを Sephadex G-75 カラム (内径 14 mm、カラム長さ 590 mm、ベッド体積 91 mL) へ添加し、EDTA-PBS で溶出した。カラムからの溶出液を 2 mL ずつ回収し、280 nm の吸光度を測定した。その後、抗フェツイン抗体を用いたウエスタンブロットにより各フラクションを確認した (Tamura, M. *et al.*, 2010)。

本研究では、上記のように精製した ASF を、城西大学大学院 渡邊が hGal-1 C2S 固定化カラムによりアフィニティー精製したものを使用している。

3-1-2 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体の調製

第1章と同様の方法で調製したものをを用いた。

3-1-3 架橋反応

EDTA-PBS を用いて、0.25 mg/mL とした hGal-1 変異体溶液 10 μ L に、dimethylformamide (DMF) に溶解させた BPM を終濃度 4 μ M となるように加え、暗所、室温で 30 分間反応させた。コントロールには DMF のみ加え、同様に操作した。次に、未反応の BPM のマレイミド基をブロックするため、dithiothreitol (DTT) を終濃度 10 mM となるように添加し、暗所、室温で 30 分間反応させた (反応液量 10 μ L)。反応後の溶液に、EDTA-PBS で 0.5 mg/mL としたリガンド糖タンパク質 (ASF またはラミニン) 溶液 10 μ L を添加した。そして氷上で紫外線を 30 分間照射した。

3-1-4 架橋反応検出方法 (ウエスタンブロット)

架橋産物の検出を行うために、架橋反応液を SDS-PAGE により分離後、ニトロセルロース膜へ転写した。その後、抗 hGal-1 抗血清、抗フェツイン抗血清または抗ラミニン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。

3-2 結果

3-2-1 アシアロフェツインのゲル濾過による精製

ASF の分子量は 50-60 kDa だが、購入したフェツインには高分子量 (100-150 kDa) のタンパク質が含まれていた。これは Cys 導入 hGal-1 変異体と ASF の架橋産物の検出を難しくするため、Sephadex G-75 を用いたゲルろ過クロマトグラフィーにより ASF の精製を試みた。シアリダーゼ消化したフェツイン溶液を Sephadex G-75 ゲルろ過カラムに添加し、EDTA-PBS で溶出した。溶出したフラクションを回収し、280 nm の吸光度を測定した結果を図 3-1 に示す。タンパク質が検出されたフラクション (Fr. 23-33) を、抗フェツイン抗血清を用いたウエスタンブロット法により検出した (図 3-2)。高分子量タンパク質が含まれていない Fr. 28-33 を回収した。これをガレクチン-1 固定化カラムでアフィニティー精製することで、ガレクチン-1 と結合する ASF が調製可能となった。

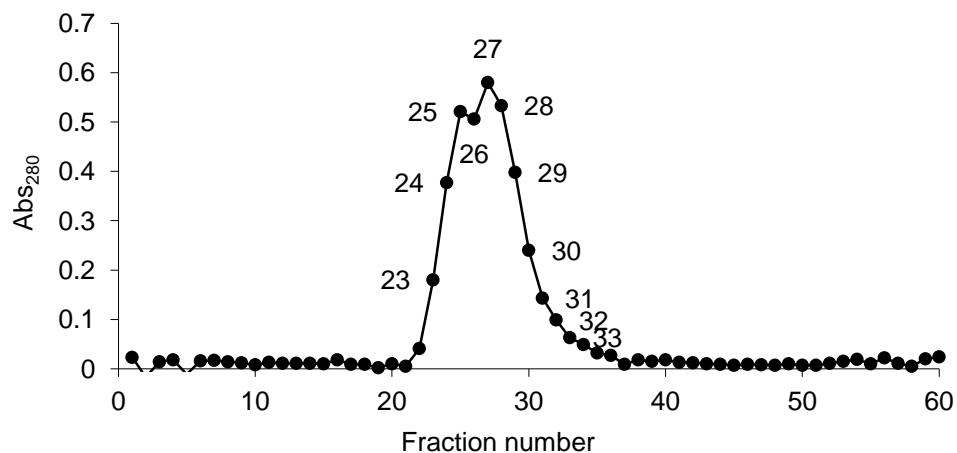


図 3-1 アシアロフェツインの Sephadex G-75 カラムからの溶出
カラムからの溶出液を 2 mL ずつ回収し、280 nm 吸光度を測定した。

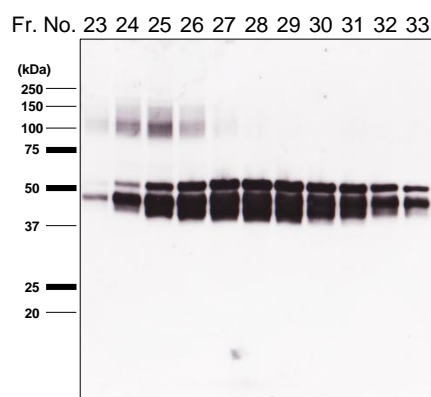


図 3-2 Sephadex G-75 カラム溶出フラクションのウエスタンブロット
Sephadex G-75 カラムからの溶出フラクション 23-33 を、抗フェツイン抗血清を用いたウエスタンブロットにより検出した。分子量マーカーは図の左側に示した。

3-2-2 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 とアシアロフェツインの架橋反応

Cys 導入 hGal-1 変異体とモデル糖タンパク質として用いた ASF の、BPM を介した架橋産物形成を、ウエスタンブロットにより検出した。図 3-3 に示すように、Cys-less では、hGal-1 または ASF のバンドのみ検出され、架橋産物のバンドは検出されなかった。それ故、hGal-1 および ASF よりも高分子量側に新たなバンドが検出された場合、導入した Cys 残基による架橋産物と考えられる。hGal-1 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C で、BPM を加えたときのみ、抗 hGal-1、抗フェツイン抗血清の両方に認識され

る新たなバンドが高分子量側に検出された。また、S7C、A51C、K63C、D123C では、この抗 hGal-1、抗フェツイン抗血清で認識される高分子量側のバンドが複数検出された。新たな高分子量側のバンドが検出された hGal-1 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C と ASF の BPM を介した架橋形成を、ラクトース存在下の反応で行った。いずれの変異体でも高分子量側のバンドは検出されなかった (図 3-4)。

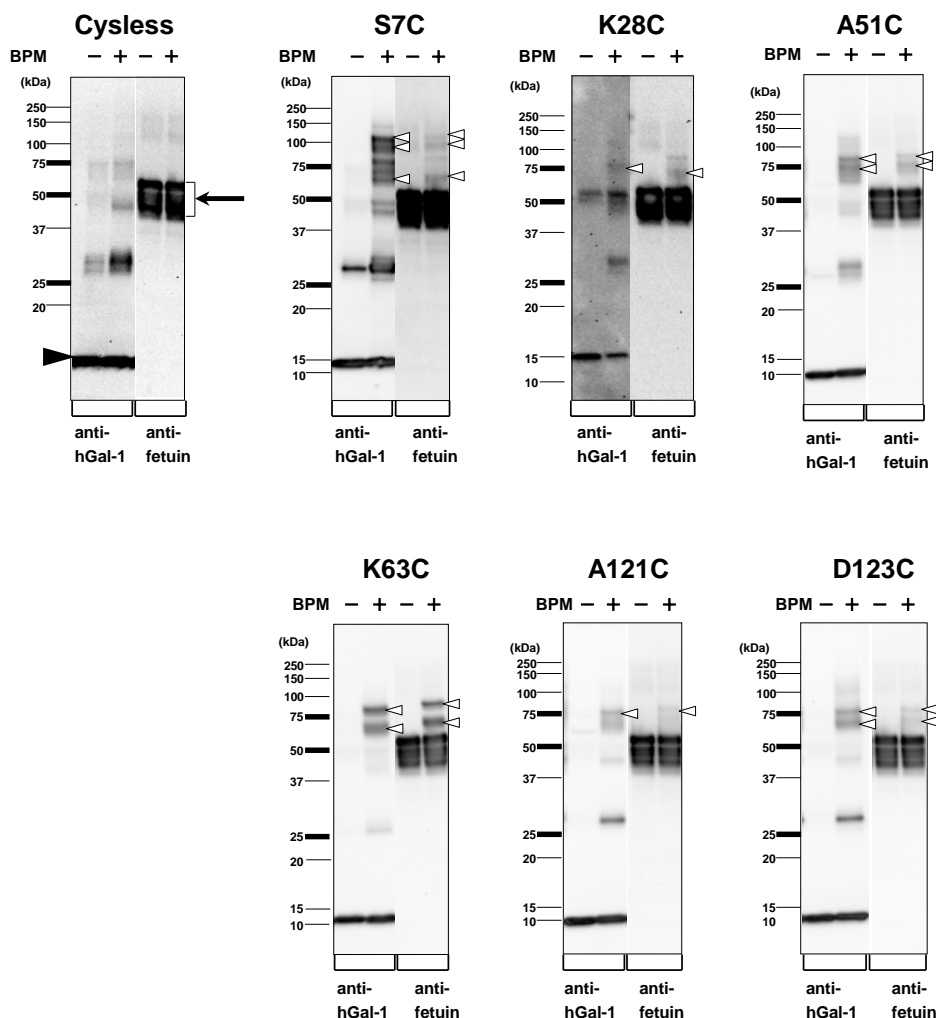


図 3-3 hGal-1 変異体と ASF との架橋反応

BPM 非存在下 (-) または存在下 (+)、hGal-1 変異体を暗所で反応させ、ASF 溶液に添加し、紫外線を照射した。SDS-PAGE により分離後、抗 hGal-1 抗血清および抗ラミニン抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。新たに検出された抗 hGal-1 抗血清と抗フェツイン抗体の両方で認識されるバンドに白の矢頭を付した。黒の矢頭は hGal-1、黒の矢印は ASF の位置を示す。分子量マーカーは図の左側に示した。

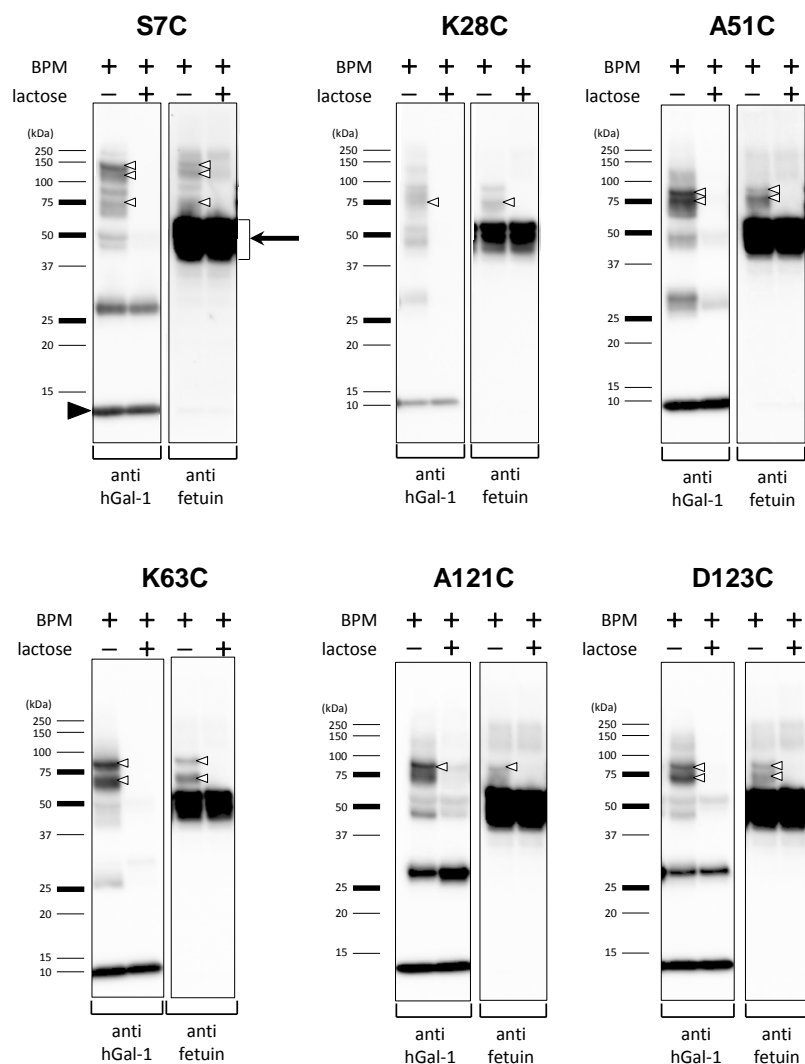


図 3-4 ラクトース存在下の hGal-1 変異体と ASF の架橋反応

ラクトース非存在下 (-) または存在下 (+)、Cys 導入 hGal-1 変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C に BPM を結合させ、ASF 溶液に添加し、紫外線照射により架橋産物形成を行った。SDS-PAGE により分離後、抗 hGal-1 抗血清および抗フェツイン抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。Cys 導入 hGal-1 変異体とフェツインの架橋産物と考えられるバンドに白の矢頭を付した。黒の矢頭は hGal-1、黒の矢印は ASF の位置を示す。分子量マーカーは図の左側に示した。

3-2-3 システイン残基導入ヒトガレクチン-1 変異体とラミニンの架橋反応

BPM を用いて、Cys 導入 hGal-1 変異体とラミニンの架橋反応を行い、ウェスタンブロットにより検出した。図 3-5 に示すように、Cys-less では、hGal-1 またはラミニンのバンドのみ検出され、架橋産物のバンドは検出されなかった。hGal-1 S7C、K28C、A51C

で、BPM を加えたときのみ、抗 hGal-1 抗血清と抗ラミニン抗血清の両方に認識されるバンドが新たに検出された。新たな高分子量側のバンドが検出された hGal-1 S7C、K28C、A51C とラミニンの BPM を介した架橋形成を、ラクトース存在下の反応で行った。いずれの変異体でも新たな高分子量側のバンドは検出されなかった (図 3-6)。

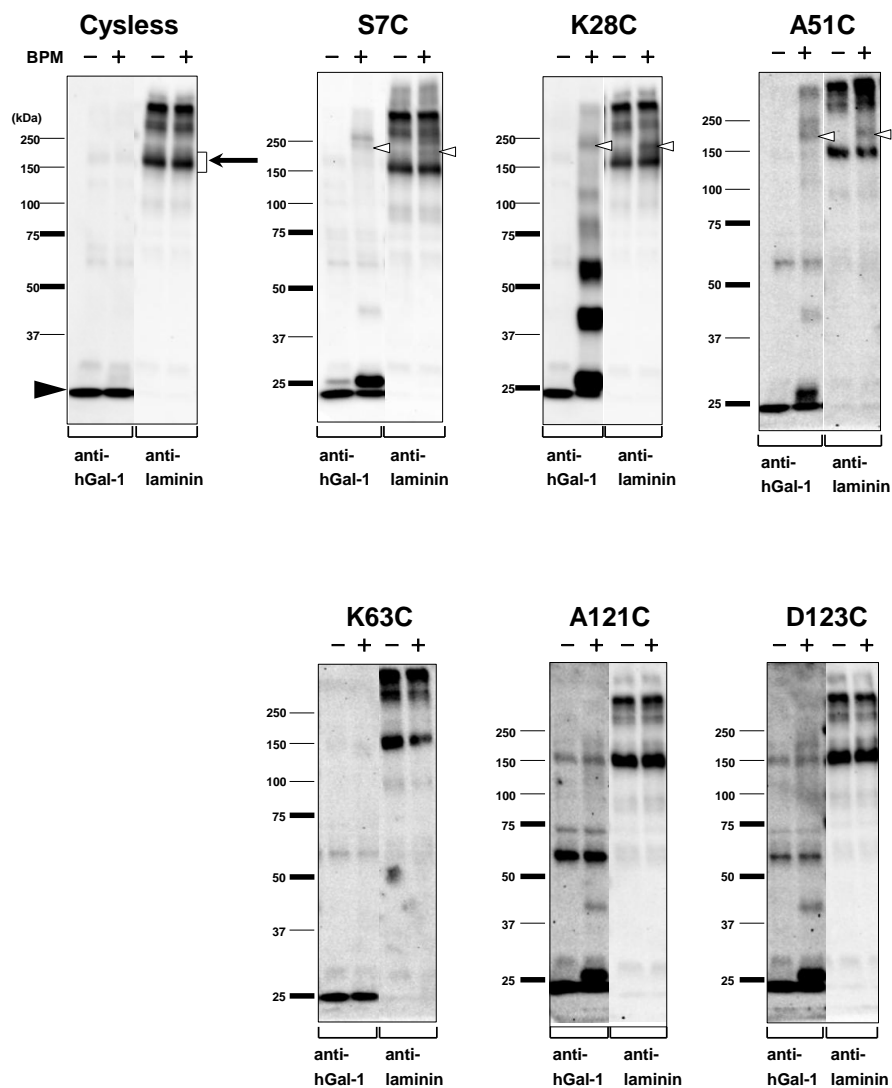


図 3-5 hGal-1 変異体とラミニンとの架橋反応

BPM 非存在下 (-) または存在下 (+)、hGal-1 変異体を暗所で反応させ、ラミニン溶液に添加し、紫外線を照射した。SDS-PAGE により分離後、抗 hGal-1 抗血清および抗ラミニン抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。新たに検出された抗 hGal-1 抗血清と抗ラミニン抗体の両方で認識されるバンドに白の矢頭を付した。黒の矢頭は hGal-1、黒の矢印はラミニンの位置を示す。分子量マーカーは図の左側に示した。

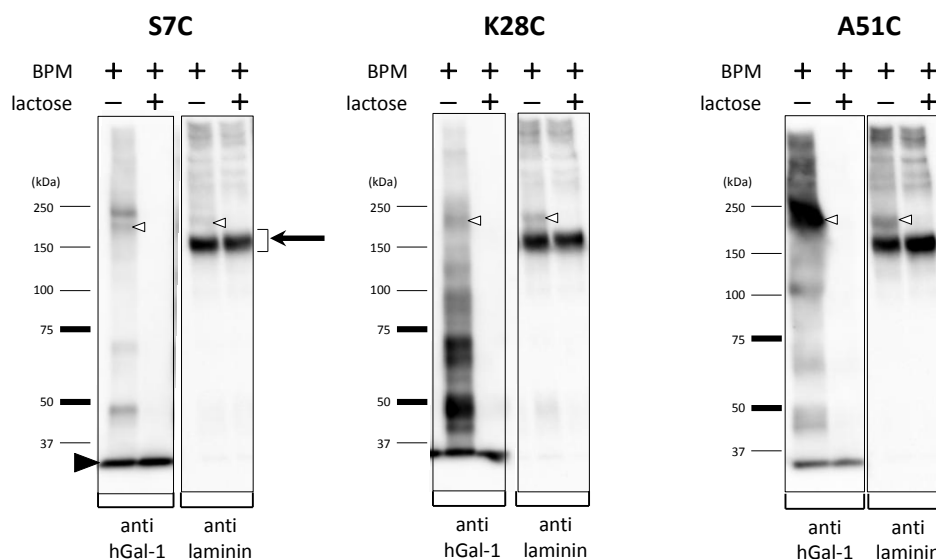


図 3-6 ラクトース存在下の hGal-1 変異体とラミニンの架橋反応

ラクトース非存在下 (-) または存在下 (+)、Cys 導入 hGal-1 変異体 S7C、K28C、A51C に BPM を結合させ、ラミニン溶液に添加し、紫外線照射により架橋産物形成を行った。SDS-PAGE により分離後、抗 hGal-1 抗血清および抗ラミニン抗体を用いたウエスタンブロットにより検出した。Cys 導入 hGal-1 変異体とラミニンの架橋産物と考えられるバンドに白の矢頭を付した。黒の矢頭は hGal-1、黒の矢印はラミニンの位置を示す。分子量マーカーは図の左側に示した。

3-3 考察

モデル糖タンパク質リガンドとして用いる ASF をゲルろ過カラムにより精製を試みた。シアリダーゼ消化フェツインを Sephadex G-75 によるゲルろ過を行ったところ、市販のフェツインに含まれる高分子量タンパク質と ASF を分離することができた。分離できた ASF をさらに hGal-1 固定化セファロースカラムで精製することで、hGal-1 に結合する ASF を回収できた。

Cys 導入 hGal-1 変異体と ASF の、BPM を介した架橋産物形成を試みた結果、6 つの変異体 S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C において、架橋産物と考えられるバンドが検出された。このうち、S7C、A51C、K63C、D123C では、架橋産物と考えられるバンドが複数検出された。ASF には主に N 結合型糖鎖 3 本、O 結合型糖鎖 3 本を持つため (Green E. D. *et al.*, 1988; Spiro R. G. and Bhoyroo V. D., 1974)、架橋形成した Cys 導入 hGal-1 変異体が結合した糖鎖によって、電気泳動移動度が異なったためと考えら

れる。または、1 分子の ASF に、2 分子以上の Cys 導入 hGal-1 変異体が BPM を介して架橋形成したと考えられる。また、これらは競合糖ラクトース存在下の反応では検出されなかったことから、Cys 導入 hGal-1 変異体が ASF の糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋産物が形成されたと考えられる。同様に、ラミニンとの架橋産物と考えられるバンドが検出された S7C、K28C、A51C でも、ラクトース存在下の反応では、架橋産物が検出されなかったことから、S7C、K28C、A51C がラミニンの糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋産物を形成したと考えられる。

各 Cys 導入 hGal-1 変異体と ASF を架橋反応した結果、S7C、K28C、A51C、K63C、A121C、D123C において、架橋産物と考えられるバンドが検出された。一方、各 Cys 導入 hGal-1 変異体とラミニンを架橋反応した結果、S7C、K28C、A51C において架橋産物と考えられるバンドが検出された。ASF とラミニンの両方と架橋産物が検出された S7C、K28C、A51C が hGal-1 のリガンド探索に用いるのに適していると考えられる。

第4章 システイン導入ヒトガレクチン-1 変異体と Jurkat 細胞上のリガンドとの架橋反応

ガレクチン-1 は、サイトカインの産生やアポトーシス誘導の調節により、T 細胞の分化や機能の調節に関与すると考えられている。本研究ではガレクチン-1 の T 細胞アポトーシス誘導に関与するリガンドの探索を試みた。ガレクチン-1 誘導性 T 細胞アポトーシスのリガンドとして、CD3、CD4、CD7、CD43、CD45 などが報告されている (Pace, K. E. *et al.*, 1999; Camby, I., *et al.* 2006; Garner, O. *et al.*, 2008)。しかし、アポトーシス誘導に CD45 が必須でない場合もある (Elora, Y., *et al.*, 2005)。

ガレクチン-1 の細胞死誘導には転写ファクター (NFAT、AP-1) の誘導、Lck/ZAP-70/MAPK シグナル経路の活性化、ミトコンドリア膜の脱分極とシトクローム c の放出、カスパーゼ経路の活性化などが関与する (Camby, I. *et al.*, 2006) と考えられている。しかし、カスパーゼ-3 の活性化やシトクローム c の放出に依存しない細胞死誘導も報告もあり (Hahn H. P. *et al.*, 2004)、ガレクチン-1 の T 細胞細胞死に対する機能には不明な点も多く残されている。

そこで、T 細胞の研究によく用いられてきたヒト T 細胞株 Jurkat 細胞の、ガレクチン-1 誘導性アポトーシスに関与する hGal-1 リガンドの探索を、Cys 導入 hGal-1 変異体と BPM を用いた方法で試みた。Cys 導入 hGal-1 変異体は、糖結合特性が野生型と大きく変わらず、モデル糖タンパク質 ASF およびラミニンと BPM を介した架橋産物を形成した hGal-1 K28C を用いて行った。その際、架橋産物の検出と精製が容易になるように C 末端側に FLAG タグ配列を付加したもの (hGal-1 K28C cFLAG) を用いた。

4-1 実験方法

4-1-1 実験材料

抗 FLAG[®] M2 モノクローナル抗体は Sigma (St. Louis, MO, USA) より購入した。

4-1-2 C 末端側 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C 発現用プラスミドの調製

帝京大学大学院 五十嵐が、遺伝子組み換えにより hGal-1 K28C の C 末端側に FLAG 配列を付加した DNA を pET21a プラスミドに挿入したものを調製した。

4-1-3 C 末端側 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C タンパク質の調製

第1章と同様の方法で調製した。

4-1-4 C 末端側 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C タンパク質の質量分析

EDTA-PBS に 0.42 mg/mL となるように溶解させた hGal-1 K28C CFLAG 溶液 20 μ L に、DMF に溶解させた BPM を、終濃度 160 μ M に加えたサンプル、室温、暗所にて 30 分間反応させた。コントロールには DMF のみ加え、同様に操作した。その後、SDS-PAGE を行い、CBB 染色した。検出された hGal-1 K28C cFLAG のバンドを切り出し、50% アセトニトリルを含む 50 mM 炭酸水素アンモニウム溶液を加え 10 分間置くことを 4 回繰り返して脱色した。その後、10 mM DTT を含む 50 mM 炭酸水素アンモニウムを 100 μ L 加え、56°C で 45 分間処理することにより還元し、55 mM ヨードアセトアミドを含む 50 mM 炭酸水素アンモニウムを加え、室温で 30 分間処理した。続いて、ゲル断片を 50% アセトニトリルを含む 25 mM 炭酸水素アンモニウム 100 μ L で 2 回洗浄後、減圧遠心機により乾燥させた。そして 20 μ g/mL トリプシン (Mass Spectrometry Grade, Promega) を加え、氷上で 45 分間静置し、ゲルを膨潤させた。37°C で 24 時間処理し、消化を行った。ゲル断片に 50% アセトニトリルを含む 25 mM を 50 μ L 加え 15 分間静置し、ペプチドを溶出させ、減圧遠心機により乾固させた。

乾固させたペプチドに 10 μ L の 0.1% TFA を加え、ZipTip に吸着させ、マトリックス溶液 (5 mg/mL CHCA、50% アセトニトリル、0.1% TFA) 2 μ L でサンプルプレート上に溶出させた。室温で乾燥させた後、MALDI AXIMA CFR plus (島津) のリフレクトロンモードで検出した。

4-1-5 Jurkat 細胞の培養方法

Jurkat 細胞 (RBRC-RCB0806, RIKEN Cell Bank) は、RPMI-1640 培地 (Wako) に FBS (Fetal Bovine Serum, Hyclone, SH30088.03)、抗生物質 (10,000 units/mL ペニシリン G, 10,000 μ g/mL ストレプトマイシン硫酸塩) を加えた培地で、37°C、5% CO₂ 条件下、10-cm dish で培養した。

4-1-6 ガレクチン-1 が Jurkat 細胞生存能に与える影響の測定

Jurkat 細胞を 50,000 cells/100 μ L/well となるように Countess® Automated Cell counter (Life technologies) を用いて細胞懸濁液を調製した後、96 ウェルプレートに播種し、37°C、5% CO₂ で 2 時間インキュベートした。その後 hGal-1 K28C cFLAG タンパク質を終濃度 0、10、20、30 μ M になるように 10 μ L/well 添加した。37°C、5% CO₂ で 24 時間インキュベートした後、PrestoBlue™ Cell Viability Reagent (Life technologies) を 10 μ L/well で添加した。37°C で 1 時間インキュベートした後、蛍光強度 (励起波長 544 nm、蛍光波長 590 nm) をマイクロプレートリーダー (SpectraMax M5, Molecular Devices) で測定した。

4-1-7 架橋反応に用いる Jurkat 細胞懸濁液の調製

培養した Jurkat 細胞を含む培地を回収し、1,000 rpm で 10 分間遠心分離した。培地を取り除いた後、10 mL の D-PBS(-)を加え、1,000 rpm で 5 分間遠心分離した。この操作をもう一度行い細胞を洗浄した後、目的の細胞数となるように D-PBS(-)を加えた。これを、Jurkat 細胞懸濁液として、架橋反応に用いた。

4-1-8 C 末端 FLAG タグ付加 hGal-1 K28C と Jurkat 細胞の架橋反応

EDTA-PBS に、1.7 mg/mL (約 120 μ M)となるように溶解した hGal-1 K28C cFLAG 溶液に、DMF に溶解した BPM を、終濃度 80 μ M となるように加え、室温、暗所にて 30 分間反応させた。コントロールには DMF のみを加えた。次に、未反応の BPM のマレイミド基をブロックするため、DTT を終濃度 20 mM となるように添加し、室温、暗所にて 30 分間反応させたのち、反応液と等量の樹脂 (Fluorescent Dye Removal Column kit, Thermo)にて未反応の BPM を除いた。60 μ L の 0.84 mg/mL hGal-1 K28C cFLAG となるように希釈し、そこに、上記のように 1.0×10^6 cells/mL に調製した Jurkat 細胞懸濁液を 60 μ L を加え、氷上で紫外線 (365 nm, 24 W) を 30 分間照射した。低張 buffer (1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.4) を 1 mL 加え、4°C で 30 分間反応後、超音波破を 1 秒間照射した。4°C 14,000 rpm で 20 分間遠心分離後、上清を除いた。再び低張 buffer を加え、4°C 14,000 rpm で 20 分間遠心操作を行なった。上清を除き、40 μ L の SDS-Sample buffer (250 mM Tris-HCl, pH 6.8, 5% 2-mercaptoethanol, 10% SDS, 50% glycerol, BPB) を加え、70°C にて 10 分間熱処理した。このサンプルを 1 秒間超音波処理し、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。

4-2 結果

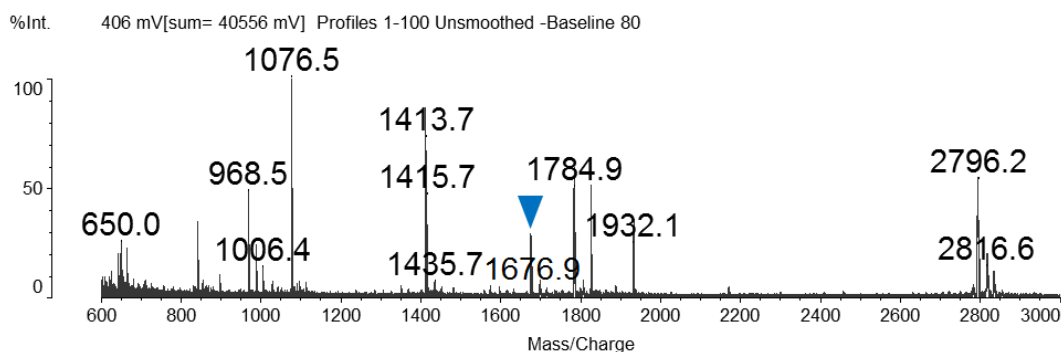
4-2-1 質量分析によるシステイン残基への BPM 結合の確認

hGal-1 K28C cFLAG の Cys 残基に BPM が結合しているかどうか、トリプシン消化後、質量分析を行うことにより確認した。hGal-1 K28C cFLAG へ BPM を加え (BPM +)、暗所で反応させ、SDS-PAGE 後、CBB 染色により検出された hGal-1 K28C cFLAG のバンドを切り出し、還元・アルキル化処理後、ゲル内トリプシン消化し、ゲルから溶出されたペプチド断片の質量を MALDI-TOF-MS により測定した。コントロールとして DMF を加えた (BPM -) hGal-1 K28C cFLAG を用いた。

MALDI-TOF-MS により得られたスペクトルを図 4-1 に示す。トリプシン消化により Cys²⁸を含む断片は G²¹EVAPDACSFVLNLGK³⁶ (Gly²¹-Lys³⁶) となり、その理論値は 1619.8 となる (PeptideMass, http://web.expasy.org/peptide_mass/ により計算)。Cys²⁸がアルキル化されていると、その質量の理論値は 1676.81 となる。コントロールの DMF のみを加えた hGal-1 K28C cFLAG には 1676.9 のピークが検出された (図 4-1, A)。また、このペ

プチド断片に BPM が結合したときの質量は $1619.8 + 277.3$ (BPM の分子量) $+18.0$ (MS 測定時 BPM のマレイミド基が加水分解されている (Leszyk J., *et al.*, 1998; Warren C. M., *et al.*, 2009)) $= 1915.1$ となる。BPM を加えたサンプルでは 1914.4 のピークが検出された (図 4-1, B)。このピークは BPM を加えていないサンプルでは検出されなかった。

A. BPM-



B. BPM+

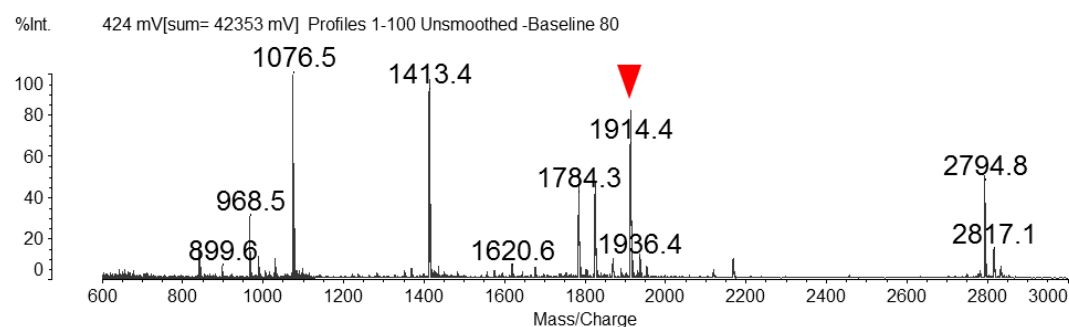


図 4-1 ゲル内トリプシン消化 hGal-1 K28C cFLAG の MALDI-TOF-MS スペクトル
BPM 非添加 (A) および添加 (B) hGal-1 K28C cFLAG をゲル内トリプシン消化し、MALDI-TOF-MS により測定した。青の▼は Gly²¹-Lys³⁶ の Cys²⁸ がアルキル化されたピーク (1676.9) を、赤の▼は Gly²¹-Lys³⁶ の Cys²⁸ に BPM (マレイミド基が加水分解している) が結合したピーク (1914.4) を示す。

4-2-2 ガレクチン-1 が Jurkat 細胞生存能に与える影響

最初に、hGal-1 K28C cFLAG によって Jurkat 細胞の細胞死が誘導されることを確認した。hGal-1 K28C cFLAG を 5.0×10^5 cells/mL Jurkat 細胞に添加し、Jurkat 細胞の細胞生存能に与える影響を検証した。その結果、終濃度 30 μ M の hGal-1 K28C cFLAG を添加したとき、約 40% の細胞生存率の減少が確認できた (図 4-2)。hGal-1 K28C cFLAG によって Jurkat 細胞の細胞死が誘導されることを確認した。

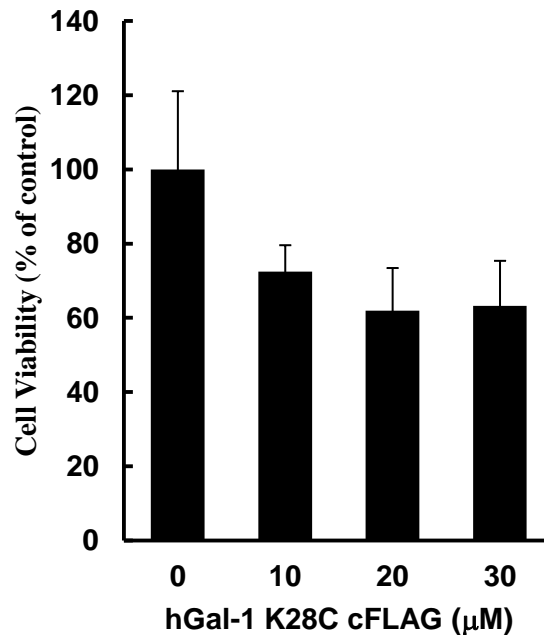


図 4-2 hGal-1 K28C cFLAG が細胞生存能に与える影響

Jurkat 細胞に hGal-1 K28C cFLAG を添加し、24 時間培養後、PrestoBlue™ Cell Viability Reagent を添加し、蛍光強度を測定した。データは 4 サンプルの平均値±標準偏差で提示した。

4-2-3 Jurkat 細胞上のリガンドとの架橋反応の結果

hGal-1 K28C cFLAG による Jurkat 細胞の細胞死誘導が確認できた条件で BPM を用いた架橋反応を行った。30 μM の BPM 付加済み hGal-1 K28C cFLAG を 5.0×10^5 cells/mL Jurkat 細胞へ添加後、紫外線照射し、Jurkat 細胞上のリガンドと BPM を介した架橋産物形成を行い、架橋反応液をウェスタンブロット法により検出した (図 4-3)。BPM 反応済み hGal-1 K28C cFLAG を Jurkat 細胞を含まない PBS に添加し、紫外線照射した場合、hGal-1 よりも高分子量側にラダー状にバンドが検出された (図 7, lane 4)。これは、hGal-1 が二量体を形成するため⁹⁾、hGal-1 の二量体同士が BPM を介して架橋した可能性がある。しかし、BPM 反応済み hGal-1 K28C cFLAG を Jurkat 細胞を含む PBS に添加したときに、250 kDa と 300 kDa 付近に新たなバンドが検出された (図 7, lane 2)。また、このバンドは競合糖ラクトース存在下の反応では検出されなかった (図 7, lane 3)。以上のことから、hGal-1 K28C cFLAG が Jurkat 細胞上のリガンドの糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋が形成されたと考えられる。検出された架橋産物と考えられるバンドは、ガレクチン-1 の細胞死誘導に関わるリガンドを含む可能性がある。今後、この架橋産物を精製し、質量分析を利用してリガンドの同定を行う予定である。

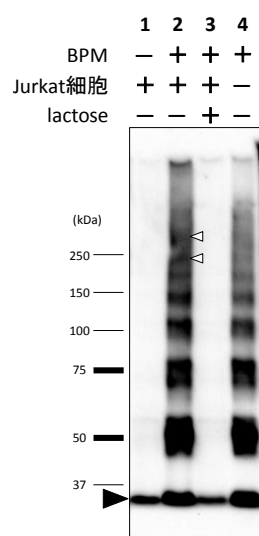


図 4-3 hGal-1 K28C cFLAG と Jurkat 細胞の架橋反応

BPM と hGal-1 K28C cFLAG を暗所で反応させ、Jurkat 細胞懸濁液に添加し、紫外線を照射した。細胞破碎後、SDS-PAGE により分離し、抗 FLAG 抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。BPM 反応済み hGal-1 K28C cFLAG を Jurkat 細胞に添加した場合にのみ検出された新たなバンドに白の矢頭を付した。黒の矢頭は hGal-1 K28C cFLAG の位置を示す。分子量マーカーは図の左側に示した。

4-3 考察

今までの架橋産物が、確かに hGal-1 に導入された Cys 残基に結合した BPM を介していたのか確認するため、Cys 残基への BPM の結合を質量分析により確認した。BPM 非添加または添加 hGal-1 K28C cFLAG を SDS-PAGE、CBB 染色により検出された hGal-1 K28C cFLAG のバンドを切り出し、還元・アルキル化処理後、ゲル内トリプシン消化し、ゲルから溶出されたペプチド断片の質量を MALDI-TOF-MS により測定した。BPM 添加したときのみ、Cys²⁸ に BPM が結合したと考えられる質量 1914.4 のペプチド断片が検出された (図 4-1)。hGal-1 K28C cFLAG の Cys 残基に BPM が結合していることが確認できた。

hGal-1 K28C cFLAG によって Jurkat 細胞の細胞死が誘導されることを確認した。hGal-1 K28C cFLAG を Jurkat 細胞に添加したところ、終濃度 30 μ M の hGal-1 K28C cFLAG を添加したときに約 40% の細胞生存率の減少が確認できた (図 4-2)。hGal-1 K28C cFLAG が Jurkat 細胞上のリガンドと相互作用し、細胞死を誘導したと示唆される。

ガレクチン-1 が T 細胞のアポトーシスを誘導する際のリガンド探索を目的として、BPM 反応済み hGal-1 K28C cFLAG をヒト T 細胞株 Jurkat 細胞へ添加し、紫外線を照射することで、リガンドとの架橋形成を行った。抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロット法により検出したところ、Jurkat 細胞の hGal-1 リガンドと架橋産物を形成したと考えられるバンドが検出された (図 4-3)。また、このバンドはラクトース存在下の反応では検出されなかった。hGal-1 K28C が Jurkat 細胞上のリガンドの糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋が形成されたと考えられる。BPM 反応済み hGal-1 K28C cFLAG に Jurkat 細胞を含まない PBS を加えた場合、hGal-1 の分子量 15 kDa よりも高分子両側にラダー状にバンド (50, 75, 100, 150, 200 kDa 付近) が検出された。hGal-1 は二量体を形成するため (Nishi, N. *et al.*, *Glycobiology*, 2008)、hGal-1 の二量体同士が BPM を介して架橋した可能性がある。hGal-1 K28C が Jurkat 細胞の細胞死を誘導することを朝倉が確認しているため、検出された架橋産物と考えられるバンドは、ガレクチン-1 の細胞死誘導に関わるリガンドと架橋された可能性がある。

ガレクチン-1 のリガンドとして、T 細胞アポトーシス誘導のリガンドである CD4、CD7、CD43、CD45 などが知られている (Pace, K. E. *et al.*, 1999; Camby, I., *et al.* 2006; Garner, O. *et al.*, 2008)。これらと架橋形成した可能性、または未知のリガンドと架橋産物を形成したと考えられる。今後、この架橋産物を精製し、質量分析を利用してリガンドの同定を行う。

結論

本研究では、架橋試薬ベンゾフェノン-4-マレイミド (BPM) を用い、ガレクチンをそのリガンドと架橋することで、これまで同定できなかった新たなリガンドを単離する方法の確立を目指した。まず、BPM のマレイミド基と結合可能なシステイン (Cys) 残基を分子内に 1 つだけ持つ、Cys 導入ヒトガレクチン-1 (hGal-1) 変異体を複数作製した。Cys 導入が糖結合特性に大きく影響しないことを確認後、各 Cys 導入 hGal-1 変異体とモデル糖タンパク質リガンドアシアロフェツイン (ASF) およびラミニンと BPM を介した架橋産物形成を試みた。hGal-1 の Ser⁷、Lys²⁸、Ala⁵¹ を Cys に置換した変異体 S7C、K28C、A51C で、ASF とラミニン両方と BPM を介した架橋産物が形成された。この架橋産物は競合糖ラクトース存在下の反応では検出されなかったことから、Cys 導入 hGal-1 変異体がりガンドの糖鎖と相互作用しているときにのみ、BPM を介した架橋産物が形成されたと考えられる。

ガレクチン-1 は、サイトカインの産生やアポトーシス誘導の調節により、T 細胞の分化や機能の調節に関与すると考えられている。本研究ではガレクチン-1 の T 細胞アポトーシス誘導に関与するリガンドの探索を試みた。ガレクチン-1 誘導性 T 細胞アポトーシスのリガンドとして、CD3、CD4、CD7、CD43、CD45 などが報告されている (Pace, K. E. *et al.*, 1999; Camby, I., *et al.* 2006; Garner, O. *et al.*, 2008)。しかし、アポトーシス誘導に CD45 が必須でない場合もある (Elora, Y., *et al.*, 2005)。

ガレクチン-1 の細胞死誘導には転写ファクター (NFAT、AP-1) の誘導、Lck/ZAP-70/MAPK シグナル経路の活性化、ミトコンドリア膜の脱分極とシトクローム c の放出、カスパーゼ経路の活性化などが関与する (Camby, I. *et al.*, 2006) と考えられている。しかし、カスパーゼ-3 の活性化やシトクローム c の放出に依存しない細胞死誘導も報告もあり (Hahn H. P. *et al.*, 2004)、ガレクチン-1 の T 細胞細胞死に対する機能には不明な点も多く残されている。

そこで、T 細胞の研究によく用いられてきたヒト T 細胞株 Jurkat 細胞の、ガレクチン-1 誘導性アポトーシスに関与する hGal-1 リガンドの探索を、Cys 導入 hGal-1 変異体と BPM を用いた方法で試みた。Cys 導入 hGal-1 変異体は、糖結合特性が野生型と大きく変わらず、モデル糖タンパク質 ASF およびラミニンと BPM を介した架橋産物を形成した hGal-1 K28C を用いて行った。

その結果、BPM 反応済み hGal-1 K28C をヒト T 細胞株 Jurkat 細胞に添加し、ウェスタンブロットにより検出した結果、Jurkat 細胞上のリガンドと架橋産物を形成したと考えられるバンドが検出された。検出された架橋産物と考えられるバンドには、ガレクチン-1 が Jurkat 細胞死を誘導する際のリガンドと架橋された可能性がある。今後、この架橋産物を精製し、質量分析等により、リガンドの同定を行う予定である。

この架橋産物は BPM を介した共有結合により架橋しているため、架橋産物の抽出(細

胞の溶解)とその後の精製過程(免疫沈降など)で解離しない。このため、従来のアフィニティークロマトグラフィーや免疫沈降法などによるリガンドの抽出・精製では同定できなかったガレクチン-1 リガンドの同定が可能になると考えている。

Cys 導入 hGal-1 変異体と架橋試薬 BPM を用いた本手法により、ガレクチンリガンドの網羅的な単離・解析によるガレクチンの分子レベルでの機能解明に近づけると考えられる。また、今後、本手法が「相互作用は弱くても重要な生体物質」の単離・同定・解析にも応用できると期待している。

参考文献

- Arata Y., Baleja J. D., Forgac M., *Biochemistry*, 41, 11301-11307 (2002)a.
- Arata Y., Baleja J. D., Forgac M., *J. Biol. Chem.*, 277, 3357-3363 (2002)b.
- Arata Y., Hirabayashi J., Kasai K., *J. Biol. Chem.*, 276, 3068-3077 (2001).
- Arata Y., Tamura M., Nonaka T., Kasai K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 350, 185-190 (2006).
- Barondes S. H., Castronovo V., Cooper D. N. W., Cummings R. D., Drickamer K., Feizi T., Gitt M. A., Hirabayashi J., Hughes C., Kasai K., Leffler H., Liu, F.-T., Lotan R., Mercurio A. M., Monsigny M., Pillai S., Poirer F., Raz A., Rigby P.W.J., Rini J. M., Wang J. L., *Cell*, 76, 597-598 (1994).
- Camby I., Le Mercier M., Lefranc F., Kiss R. *Glycobiology*, 16, 137R-157R (2006).
- Cooper D. N., Barondes S. H., *Glycobiology*, 9, 979-984 (1999).
- Di Lella S., Sundblad V., Cerliani J. P., Guardia C. M., Estrin D. A., Vasta G. R., Rabinovich G. A., *Biochemistry*, 50, 7842-7857 (2011).
- Dormán G., Prestwich G. D., *Biochemistry*, 33, 5661-5673 (1994).
- Elola M. T., Chiesa M. E., Alberti A. F., Mordoh J., Fink N. E., *J. Biomed. Sci.*, 12, 13-29 (2005).
- Garner O., Baum L. G., *Biochem. Soc. Trans.*, 36, 1472-1477 (2008).
- Green E. D., Adelt G., Baenziger J. U., Wilson S., Van Halbeek H., *J. Biol. Chem.*, 263, 18253-18268 (1988).
- Hahn H. P., Pang M., He J., Hernandez J. D., Yang R. Y., Li L. Y., Wang X., Liu F. T., Baum L. G., *Cell Death Differ.*, 11, 1277-1286 (2004).
- Hernandez J. D., Baum L. G., *Glycobiology*, 12, 127R-136R (2002).
- Hirabayashi J., Hashidate T., Arata Y., Nishi N., Nakamura T., Hirashima M., Urashima T., Oka T., Futai M., Müller W. E. G., Yagi F., Kasai K., *Biochim. Biophys. Acta*, 1572, 232-254 (2002).
- Hirabayashi J., Kawasaki H., Suzuki K., Kasai K., *J. Biochem.*, (Tokyo), 101, 987-995 (1987).
- Hirabayashi J., Kasai K., *Glycoconj. J.*, 11, 437-442 (1994).
- Hirabayashi J., Kasai K., *J. Biol. Chem.*, 266, 23648-23653 (1991).
- Kasai K., Hirabayashi J., *J. Biochem.* (Tokyo), 119, 1-8 (1996).
- Kasai K., *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 45, 167-170 (1997).
- Leffler H., Carlsson S., Hedlund M., Qian Y., Poirier F., *Glycoconj. J.*, 19, 433-440 (2004).
- Leszyk J., Tao T., Nuwaysir L. M., Gergely J., *J. Muscle Res. Cell Motil.*, 19, 479-490 (1998).
- Liu F. T., Rabinovich G. A., *Nat. Rev. Cancer*, 5, 29-41 (2005).

- López-Lucendo M. F., Solís D., André S., Hirabayashi J., Kasai K., Kaltner H., Gabius H.-J., Romero A., *J. Mol. Biol.*, 343, 957-970 (2004).
- Nishi N., Abe A., Iwaki J., Yoshida H., Itoh A., Shoji H., Kamitori S., Hirabayashi J., Nakamura T., *Glycobiology*, 18, 1065-1073 (2008).
- Ozeki Y., Matsui T., Yamamoto Y., Funahashi M., Hamako J., Titani K., *Glycobiology*, 5, 255-261 (1995).
- Pace K. E., Lee C., Stewart P. L., Baum L. G., *J. Immunol.*, 163, 3801-3811 (1999).
- Saravanan C., Liu F.T., Gipson I. K., Panjwani N., *J. Cell Sci.*, 122, 3684-3693 (2009).
- Spiro R. G., Bhoyroo V. D., *J. Biol. Chem.*, 249, 5704-5717 (1974).
- Stowell S. R., Arthur C. M., Mehta P., Slanina K. A., Blixt O., Leffler H., Smith D. F., Cummings R. D., *J. Biol. Chem.*, 283, 10109-10123 (2008).
- Takeuchi T., Nishiyama K., Sugiura K., Takahashi M., Yamada A., Kobayashi S., Takahashi H., Natsugari H., Kasai K., *Glycobiology*, 19, 1503-1510 (2009).
- Tamura M., Igarashi T., Kasai K., Arata Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390, 581-584 (2009).
- Tamura M., Takeuchi T., Nonaka T., Kasai K., Arata Y., *Biol. Pharm. Bull.*, 34, 929-932 (2011).
- Tamura, M., Igarashi, T., Kasai, K., Arata, Y., *Yakugaku Zasshi*, 130, 1375-1379 (2010).
- Tamura, M., Watanabe, T., Igarashi, T., Takeuchi, T., Kasai, K., Arata, Y., submitted.
- Warren C. M., Kobayashi T., Solaro R. J., *J. Biol. Chem.*, 284, 14258-14266 (2009).
- 笠井献一、松本勲武、別府正敏、東京化学同人 (1991).
- 平林淳、生化学、76、256-268 (2004).

謝辞

本研究に際し、終始懇切丁寧なご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学大学院 薬学研究科 分子免疫学講座 教授 荒田洋一郎 先生に深甚なる謝意を表します。

本論文作成に当たり、ご指導、ご鞭撻を賜りました城西大学 大学院 薬学研究科 臨床薬理学講座 教授 荻原政彦 先生ならびに城西大学 大学院 薬学研究科 生体分析化学講座 教授 新津勝 先生に深謝の意を表します。

また、終始ご指導並びにご助言を賜りました城西大学 大学院 薬学研究科 分子免疫学講座 助教 武内智春 先生に深謝の意を表します。

さらに、終始研究を見守っていただき、ご指導ならびにご助言を賜りました帝京大学 薬学部 名誉教授 笠井献一 先生に深謝の意を表します。

本研究の遂行に当たり、ご協力いただきました帝京大学大学院 薬学研究科 生物化学教室 五十嵐崇則 さん、城西大学大学院 薬学研究科 分子免疫学講座 渡邊朋恵 さん、城西大学 薬学部 分子免疫学研究室 朝倉佑磨 さん、木村加奈子 さん、佐久間彩 さん、野口大樹 さんを始めとする関係諸氏に心から感謝いたします。